Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 35, No. 3, Aug. – Sep. 2013, Pages: 46-53

Serum Levels of Nitric Oxide No and Its Relation to Frequency of T-786C Polymorphism of Nitric Oxide Synthase Gene in Patients with Coronary Artery Diseases

Fatemeh Khaki Khatibi[1], Ali Reza Yaghoubi[2*], Mohamad Rahbani nobar[1]

[1]Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2]Cardiovascular Research Center, Shahid Madani Hospital, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 19 Oct, 2012 Accepted: 2 Jan, 2013

Abstract

Backgrounds and Objectives: Mutations in endothelial nitric oxide synthase (eNOs) gene can reduced NO production. It is an endothelial relaxing factor and its decrease accelerates the process of atherosclerosis. This study was designed to measure serum level of NO and the frequency of T-786C polymorphism in a group of patients with Coronary Artery Disease (CAD) in comparision with control.

Materials and Methods: Sixty patients with angiographically diagnosed CAD and 60 age and sex matched CAD-free subjects were studied as control. Nitric oxide was measured by Griess Method. The genotype studies were carried out using allel specific PCR.

Results: Serum levels of NO in patient groups were significantly lower than the controls ($P<0.05$). Significantly higher frequency of eNOs -786C genotype was found in CAD patients than controls ($P<0.05$), the differences reflected an increase in CC genotype at position -786 of No synthesis gene. Mean blood pressure was significantly higher in patient compared with controls ($P<0.05$).

Conclusion: The low levels of NO and high blood pressure in patient group may be related to high frequency of T-786C polymorphism in patient group and conversely T-786C polymorphism may be a risk factor for coronary artery disease.

Keywords: Coronary artery disease, NO, Endothelial nitric oxide synthase gene, T-786C polymorphism

***Corresponding author:**
E-mail: Fatemeh.khakikhatibi@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقاله پژوهشی

سطح سرمی نیتریک اکساید و ارتباط آن با فراوانی پلی مورفیسم T-786C ژن NO سنتاز در بیماری عروق کرونر قلب

فاطمه خاکی خطیبی: گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
علیرضا یعقوبی: مرکز تحقیقات قلبی عروقی، شهید مدنی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، نویسنده رابط:
E-mail: Fatemeh.khakikhatibi@yahoo.com
محمد رهبانی نوبر: گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۹۱/۷/۲۸ **پذیرش:** ۹۱/۱۰/۱۳

چکیده

زمینه و اهداف: موتاسیون های متعددی در ژن نیتریک اکساید سنتاز نوع اندوتلیالی (eNOS) باعث کاهش در تولید نیتریک اکساید (NO) می شوند. NO یک عامل اتساع دهنده اندوتلیالی است و ممکن است موجب تسریع آترواسکلروزیس شود. در این مطالعه سطح سرمی نیتریک اکساید در بیماران مبتلا به بیماری عروق کرونری قلب در مقایسه با گروه شاهد و ارتباط آن با فراوانی پلی مورفیسم T-786C ژن NO سنتاز بررسی گردید.
مواد و روش ها: در این مطالعه ۶۰ بیمار که بیماری عروق کرونری قلب در آنها به وسیله آنژیوگرافی و توسط متخصص قلب مورد تایید قرار گرفته بود به عنوان گروه بیمار و ۶۰ نفر افراد طبیعی که از لحاظ سن و جنس با بیماران همسان سازی شده بود به عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. سطوح نیتریک اکساید در نمونه ها توسط روش گریس اندازه گیری شد. مطالعات ژنوتیپ توسط روش allel specific PCR مورد مطالعه قرار گرفت.
یافته ها: سطوح سرمی NO در گروه بیماران بطور قابل توجهی پائین تر از گروه شاهد بود (P۰/۰۵>). فراوانی پلی مورفیسم T-786C ژن eNOS در گروه بیماران از لحاظ آماری بطور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۵) که این در افزایش ژنوتیپ CC در موقعیت ۷۸۶- منعکس بود. فشار خون در گروه بیماران نیز بطور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۵).
نتیجه گیری: سطوح پائین NO و بالا بودن فشار خون در گروه بیماران ممکن است در ارتباط با فراوانی پلی مورفیسم T-786C در گروه بیماران باشد و در نتیجه پلی مورفیسم T-786C ژن NO ممکن است یک عامل خطر در پیشرفت بیماری آترواسکلروزیس باشد.

کلید واژه ها: بیماری عروق کرونری، نیتریک اکساید، ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی، پلی مورفیسم T-786C

مقدمه

پیشگیری از بیماری عروق کرونری Coronary Artery Disease وکاهش میزان مرگ ومیر ناشی از آن در کشورهای در حال توسعه به عنوان یک مشکل اساسی مطرح است. بیماری عروق کرونری در اثر آترواسکلروزیس به وجود می آید. آترواسکلروزیس منجر به گرفتگی عروق می شود و علل مختلفی دارد (۱). یکی از علت های مهم در CAD عملکرد غیرطبیعی اندوتلیال عروق کرونری است که موجب یک عده فرایندهای متوالی و توسعه پلاک می-گردد. این فرایندها شامل انقباض عروقی، التهاب، اکسیداسیون، پرولیفراسیون و ترومبوز می باشند. افزایش رادیکالهای آزاد که منجر به LDL اکسیده می شود، باعث می شود که عملکرد عروق بخوبی انجام نگیرد. بعنوان مثال منجر به کاهش در سطوح NO می‌گردد همچنین باعث آپوپتوزیز سلول های اندوتلیال و افزایش در تولید سلول های ماهیچه صاف و سنتز مولکول های پیش التهابی می گردد (۲). نقش عروق کرونری رساندن خون به ماهیچه های قلب است وقتی که این عروق در شخص مبتلا به CAD منقبض شود درد در ناحیه قلب ایجاد می شود (۳).

نیتریک اکساید (NO) یک عامل مهم اتساع دهنده عروق است که در اندوتلیوم تولید می شود. وجود یک ماده وازودیلاتور مشتق شده از اندوتلیوم (NO) می تواند هم اثرات فیزیولوژیک و هم اثرات پاتولوژیک مهمی داشته باشد. NO می تواند در اکثر بافت ها و سلول ها سنتز شود. از نقش های مهم آن در سیستم قلبی-عروقی، تنظیم رگ و فشار خون می باشد. از نقش های دیگر آن مهار تجمع پلاکتی، چسبندگی لکوسیت، پرولیفراسیون سلول ماهیچه صاف و اکسیداسیون LDL می باشد. کاهش تولید NO

Archive of SID

www.SID.ir

منجر به ایجاد رخدادهایی از قبیل انقباض عروقی، تجمع پلاکتی، مهاجرت مونوسیت ها به دیواره رگ، LDL اکسیده و تولید Foam cell می شود که این عوامل در پیشرفت آترواسکلروز نقش بسزائی دارند. در سیستم گردش خون NO نقش مهمی دارد زیرا به طور دقیقی تونیسیته عضله صاف سلولهای اندوتلیال را تنظیم می کند. در صورت عملکرد غیر طبیعی سلولهای اندوتلیال، اسپاسم به وجود می آید. همراهی عوامل فوق با اختلال عملکرد اندوتلیال و کاهش دسترسی به NO موجب افزایش قابلیت نفوذ عروق به لیپیدهای آتروژنیک و سلولهای التهابی نظیر منوسیت و لنفوسیتهای T می گردد. در نتیجه رویدادهای متوالی که تقویت کننده همدیگر هستند منجر به تشکیل پلاکهای آترواسکلروتیک می شوند. این رویدادها شامل نفوذ منوسیتها و ماکروفاژها از دیواره عروقی صدمه دیده و تبدیل آنها به سلولهای کف مانند (cellsfoam) (که بوسیله LDL اکسیده صورت می گیرد) و تکثیر سلولهای صاف عضلانی عروقی و انتقال آنها به طرف قسمت داخلی عروق می باشند (۵و ۴).

از طرف دیگر بیماری آترواسکلروز ناشی از یک تقابل پیچیده بین ژنتیک و عوامل محیطی می باشد (۲). اخیراً نقص آنزیم NO سنتاز اندوتلیالی (eNOS) بطور وسیعی برای پلی مورفیسم های ژنی جهت توضیح نقش ژنتیک در بیماریهای عروقی مورد مطالعه قرارگرفته است (۶). در پلی مورفیسم T-786C ژن NO سنتاز، سنتز NO پایین بوده و به نظر می رسد در این افراد زمینه برای شروع و یا ایجاد آترواسکلروز مساعد باشد (۷). از بین بسیاری از پلی مورفیسم هائی که از ژن eNOS گزارش شده است، T- 786C ارتباط زیادی باCAD دارد (۸). مطالعات و بررسی های بعمل آمده نشان می دهند که این پلی مورفیسم ارتباط متقابلی بین انواع عوامل خطر دارد (۲).

در این تحقیق برای اولین بار در استان آذربایجان شرقی (شهر تبریز) فراوانی پلی مورفیسم T-786C در ژن eNOS در بیماران مبتلا به CAD مورد مطالعه قرار گرفت. جهت پی بردن به ارتباط پلی مورفیسمT-786C در ژن eNOS با فراوانی این پلی مورفیسم در بیماران CAD تعیین و با گروه شاهد مقایسه گردید.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع توصیفی–مقایسه ای بوده و توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز تصویب گردیده است. در این مطالعه ۶۰ نفر از بیماران مبتلا به CAD مراجعه کننده به مرکز آموزشی درمانی شهید مدنی تبریز به صورت تصادفی انتخاب شدند. به همین تعداد افراد سالم که نتایج آنژیوگرافی نرمال داشتند و به این مرکز مراجعه نموده بودند به صورت تصادفی در قالب گروه شاهد انتخاب شدند. مدت زمان خونگیری از بیماران حدود ۴ ماه طول کشید. افرادی به این مطالعه وارد شدند که علائم بیماری عروق کرونر را داشته و بیماری آنها بوسیله آنژیوگرافی توسط متخصص قلب تایید شده بود. داشتن سن ۷۰–۴۰ و عدم مصرف داروهای درمان کننده هایپرلیپیدمی و عدم مصرف سیگار و عدم وجود دیابت (قند خون بالای ۱۴۰ mg/dl) در افراد CAD جزو شرایط ورود به مطالعه بوده است. بیماران با اختلالات کلیوی (کراتی نین بالای ۲ mg/dl)، افراد با نارسایی کبد، هیپرتیروئیدیسم، بیماران مبتلا به نئوپلازی، افراد با سابقه MI و بیماریهای دیگر از مطالعه حذف شدند، همچنین افراد سیگاری، دیابتی و آنهائیکه CRP کیفی آنها مثبت بود(mg/dl ۱۰>) از مطالعه حذف شدند. جهت اطمینان از عدم دیابت، از گروه بیمار و سالم آزمایش قند خون ناشتا بعمل آمد. بیماران بر اساس نتایج آنژیوگرافی به دو دسته شامل بیماران با آنژیوگرام طبیعی (گروه Non CAD) بعنوان گروه شاهد و بیماران با گرفتگی عروق بعنوان گروه بیمار تقسیم شدند. داده های مربوط به فشارخون، وزن، قد، سابقه فامیلی، هیپرلیپیدمی، سن و جنس افراد بیمار از طریق چک لیست های مربوطه جمع آوری گردید.

از تمام افراد مورد مطالعه ۱۰ میلی لیتر خون در حالت ناشتا اخذ شد. ۵ میلی لیتر در لوله مخصوص جهت PCR (حاوی EDTA) و ۵ میلی لیتر دیگر در کمتر از نیم ساعت سرم نمونه ها از قسمت لخته جدا گردید و سرم ها در دمای ۸۰– درجه سانتی گراد و خون تام در دمای ۲۰– درجه سانتی گراد تا زمان مناسب نگهداری شدند. اندازه گیری نیتریک اکسید در سیستم های بیولوژیکی نیازمند دقت بسیار زیاد می باشد زیرا که نیتریک اکسید در حضور چندین مولکول محلول بیولوژیک، متحمل یک سری واکنش شده و سریعا به نیتریت و یا نیترات تبدیل می شود و در سیستم های بیولوژیک دارای نیمه عمر نسبتاً کوتاهی در حدود کمتر از یک ثانیه می باشد. نیتریت و نیترات متابولیت های نهائی نیتریک اکسید را تشکیل می دهند. مقدار نسبی نیتریت و نیترات متغیر است و نمی توان میزان آن را با اطمینان پیش بینی نمود. بنابراین بهترین شاخص تعیین کل نیتریک اکسید، بدست آوردن مجموع نیتریت و نیترات می باشد (۹).

روش گریس یک روش مستقیم و ساده جهت اندازه گیری دو متابولیت نیتریک اکسید یعنی نیتریت و نیترات می باشد که توسط دستگاه الایزا مورد اندازه گیری قرار گرفت (۹).

روش های مختلفی جهت استخراج DNA از خون وجود دارد که در آزمایش های بیولوژی مولکولی بکار می رود. در این تحقیق استخراج DNA بر اساس حلالیت متفاوت (استفاده از حلال های آلی) انجام گردید. لازمه یک PCR موفق، داشتن DNA خالص به مقدار معین است. جهت بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده می توان از دو روش معمولی اسپکتروفتومتری و الکتروفورز استفاده کرد که در این مطالعه از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. آزمایش PCR بر روی کلیه نمونه ها برای پلی مورفیسم T-786C از ژن eNOs انجام گردید. پرایمرهای مورد نیاز برای انجام PCR، توسط نرم افزار Primer-3 طراحی شدند و بعد از طراحی با استفاده از Primer-Blast، اختصاصیت آن برای ژن مورد نظر تایید شد. توالی پرایمرهای Forward و Reverse مورد نیاز جهت تکثیر قسمتی از پروموتور ژن eNOS جهت بررسی پلی مورفیسم T-786C بصورت زیر می باشد:

C0: TTT CTC CAG CCC CTC AGA TG
C: GGC AGA GGC AGG GTC AGA CG۲۶۸۴
2684T: CAT CAA GCT CTT CCC TGT CT
T0: AGG CCC AGC AAG GAT GTA GT

Archive of SID

www.SID.ir

برای ژنوتایپینگ eNOS ابتدا DNA از نمونه های خون محیطی (لنفوسیت) با استفاده از کیت استخراج DNA پرومگا استخراج گردید. برای ژنوتایپینگ اللهای TوC در ژن eNOS از روش Allele-specific PCR استفاده شد. به این ترتیب که دو جفت پرایمر برای تکثیرDNA طراحی گردید که در جفت اول، پرایمر Revers حامل الل C بود. الل T در پرایمر Forward معرفی شد. جهت کنترل PCR، پرایمر C0 و T0 که ناحیه ای بطول bp ۳۸۷ را فاصله گذاری می کند، بکار برده شده است. محصولات PCR با روش الکتروفورزیز آنالیز شدند.محصولات PCR، بسته به نوع ژنوتیپ، سایزهای متفاوتی داشتند. آلل Cو T به ترتیب محصولات bp۱۷۶ و bp۲۵۰ تولید نمود. داده های به دست آمده از مطالعه بوسیله روش های آماری توصیفی (فراوانی- درصد و میانگین± انحراف معیار) آزمون تفاوت میانگین (آزمون t) برای گروههای مستقل و آزمون رابطه مجذور کای (کای اسکوئر) جهت مقایسه متغیرهای کیفی و کمی در دو گروه مورد مطالعه و آزمون تحلیل واریانس یکطرفه و تحلیل واریانس دو عامله جهت بررسی اثر هر یک از متغیرها بر روی شاخص های آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه کلیه آنالیزها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-15 مورد بررسی و تجزیه و تحلیل آماری قرارگرفت. در این مطالعه مقدار P< ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار تلقی شد. نرمال بودن توزیع داده ها بوسیله آزمون کلموگروف-اسمیرنوف و نمودار Q-Q مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها

مطالعه ما بر روی ۱۲۰ نفر (۶۰ نفر بیمار و ۶۰ نفر شاهد) انجام گردید و نتایج حاصل در بیماران با نتایج افراد سالم مقایسه شد. میانگین سن در گروه بیمار ۹ ± ۵۸ سال و در گروه شاهد ۱۱ ± ۵۷ سال بود. برخی مشخصات افراد مورد مطالعه در قالب گروه های بیمار و شاهد در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. اختلاف معنی دار بین دو گروه در سن، جنس و سابقه فامیلی وجود نداشت اما در فشارخون (هیپرتانسیون) اختلاف معنی دار بین دو گروه وجود داشت (جدول۱).

میانگین سطح گلوکز در بیماران ۴/۱ ± ۱۰۵/۸۵ و میانگین سطح گلوکز در گروه شاهد mg/dl ۱۹/۸۱ ± ۹۸/۱۳ بود.

میانگین نیتریک اکساید (NO) در گروه بیمار (μM) ۶۸/۲۶ ± ۱۰۱/۷۵ و در گروه شاهد (μM) ۵۶/۵۱ ± ۱۲۲/۴۶ بود. بررسی نتایج آزمون t برای گروه های مستقل نشان داد که تفاوت میانگین NO در دو گروه از لحاظ آماری معنی دار می باشد (p<۰/۰۵) بطوریکه سطوح سرمی NO در گروه بیمار بطور معنی داری پایین تر از گروه کنترل بود (جدول۲).

در آزمایش مولکولی پس از استخراج DNA بر روی کلیه نمونه ها، آزمایش PCR انجام گرفت و پس از آنکه وجود محصولات PCR بر روی ژل آگاروز تایید شد، نتیجه نمونه ها بدست آمد. نتیجه آزمایش مولکولی به شرح زیر می باشد: تصویر مربوط به محصولات PCR پلی مورفیسم T-786C ، قطعه الل C با اندازه ۱۷۶ جفت باز، قطعه الل T با اندازه ۲۵۰ جفت باز و کل قطعه با اندازه ۳۸۷ در شکل ۲ آورده شده است. وجود باند در محل ۱۷۶ و ۳۸۷ در ژل، بیانگر ژنوتیپ CC می باشد و وجود باند در محل ۲۵۰ و ۳۸۷، بیانگر ژنوتیپ TT می باشد و نمونه هایی که ژنوتیپ TC دارند در سه محل ۱۷۶، ۲۵۰ و ۳۸۷ دارای باند الکتروفورزی می باشند. همان طوری که در جدول ۳ نشان داده شده است بررسی نتایج آزمون رابطه مجذور کای نشان داد که اختلاف توزیع فراوانی ژنوتیپ های TT/TC/CCدر دو گروه مورد مطالعه از لحاظ آماری معنی دار می باشد (p =۰/۰۳) (شکل۱) .

جدول۱: داده های بالینی گروه های بیمار و کنترل

مشخصات	بیماران(تعداد=۶۰) میانگین ± انحراف معیار	کنترل(تعداد=۶۰) میانگین ± انحراف معیار	P Value
مونث/مذکر، تعداد	۳۰/۳۰	۳۰/۳۰	غیرمعنی دار
سن،سال	۵۸±۹	۵۷±۱۱	غیرمعنی دار
**** فشارخون،تعداد (٪)**	۳۳(۵۵٪)	۲۲(۳۶/۷٪)	P=۰/۰۴*
سابقه فامیلی، تعداد(٪)	۲۵(۴۱/۷٪)	۱۹(۳۱/۷٪)	غیرمعنی دار

* P<۰/۰۵ معنی دار می باشد. ** واحد فشارخون = mmHg

جدول۲: پارامتر سطوح نیتریک اکساید (NO) در دو گروه بیمار و کنترل

پارامتر	بیماران(تعداد=۶۰) میانگین±انحراف معیار	کنترل(تعداد=۶۰) میانگین±انحراف معیار	P value *
نیتریک اکساید(NO) (μM)	۱۰۱/۷۵±۳۸/۲۶	۱۲۲/۴۶±۵۶/۵۱	P ۰/۰۵

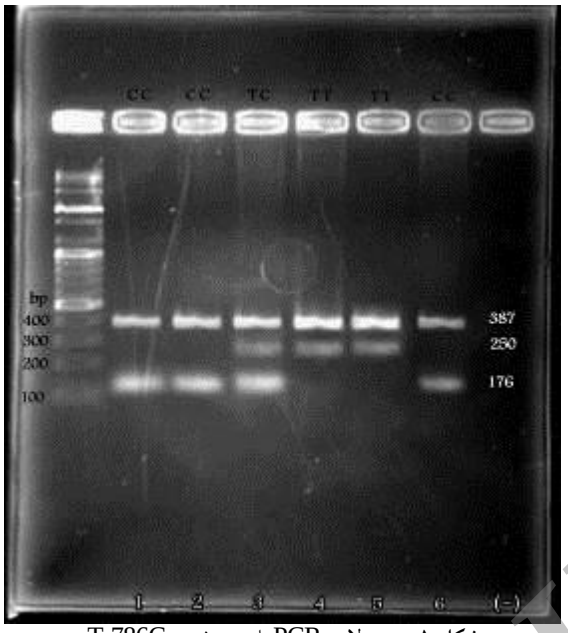
* P<۰/۰۵ معنی دار می باشد.

جدول۳: ارتباط بین ژنوتیپ های TT/TC/CC با دو گروه بیمار و کنترل

ژنوتیپ(CC)	ژنوتیپ(TC)	ژنوتیپ(TT)	گروه ها
۹	۲۸	۲۳	گروه بیمار
(۱۵ ٪)	(۴۶/۷ ٪)	(۳۸/۳ ٪)	(درصد) تعداد
۵	۱۸	۳۷	گروه کنترل
(۸/۳ ٪)	(۳۰ ٪)	(۶۱/۷ ٪)	(درصد) تعداد

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: محصولات PCR پلی مورفیسم T-786C

سمت چپ: مارکر ۱۰۰bp
سمت راست: نمونه کنترل منفی (بدون DNA)
شماره های ۱، ۲ و ۶: ژنوتیپ CC، شماره های ۴ و ۵: ژنوتیپ TT ، شماره ۳: ژنوتیپ TC

بحث

امروزه بیماری عروق کرونری بعنوان یک مشکل اساسی در جهان مطرح می باشد. تحقیقات بسیاری در جهت پیشگیری از آن در حال انجام می باشد تا بتوان با کمترین خسارت در جهت رفع این مشکل اقدام نمود. کاهش NO یک مسئله مهم در پیشرفت آترواسکلروزیس می باشد (۱۰).

در مطالعه حاضر، سطوح NO بطور معنی داری در افراد CAD کاهش یافته بود. لازم به ذکر می باشد که بیماران CAD فشار خون نیز داشتند. در همین مطالعه، سطوح NO بیماران CAD بدون فشار خون تقریبا" شبیه به گروه شاهد بود. این مطالعه نشان می دهد که وجود فشار خون نیز مهم می باشد زیرا با کاهش NO، انقباض عروق بیشتر شده، و در نتیجه باعث افزایش فشار خون خواهد شد. با وجودی که بیماران CAD، سطوح MDA افزایش یافته ای داشتند اما هیچ ارتباط معنی داری بین MDA و NO بدست نیامد.

نتایج مطالعه Kayyum و همکاران (۱۱)، کاهش معنی داری از NO را در گروه بیماران CAD در مقایسه با گروه شاهد نشان داده است. مطالعات زیادی کاهش فعالیت NO را در حالات پاتولوژیک دیگر از قبیل آسیب در اثر پرفوزیون مجدد، هیپرکلسترولمیا، دیابت ملیتوس و نارسایی مزمن قلب را گزارش نموده اند. یافته های مطالعات دیگران بطور مشخص و واضح نشان می دهد که در CAD در طی استرس اکسیداتیو که با افزایش تولید سوپر اکسید همراه است، کاهش معنی داری از NO در رگ های آترواسکلروتیک نیز به وجود می آید. مکانیسم واکنش از این قرار می باشد که سوپراکسید بطور سریع با NO واکنش می دهد و منجر به تولید پراکسی نیتریت و کاهش فعالیت NO سنتاز می گردد. پراکسی نیتریت، یک اکسیدانت قوی است که بطور فیزیولوژیک اثرات حمایتی دارد اما در مقادیر بالا علتی از ضایعات بافتی است. بنابراین تولید O_2^- که ایجاد استرس اکسیداتیو می کند منجر به انقباض عروق و اختلال اندوتلیال در بیماران CAD گردیده و در نتیجه به شدت ضایعه می انجامد. بنابراین NO یک نقش مهمی را در تنظیم تونیسیته عروق بر عهده دارد (۱۱). NO همچنین پرولیفراسیون اندوتلیال و آنژیوژنزیس را تحریک می کند و در نتیجه نقش مهمی را در میکروسیرکولاسیون ایفا می کند. همچنین NO تولید سوپراکسید توسط NADPH اکسیداز را مهار می کند (۱۲).

در مطالعه دیگری که توسط Soydinc و همکاران (۱۰) انجام گردیده مجددا" اشاره به ارتباط استرس اکسیداتیو با NO شده است. بدین صورت که افزایش استرس اکسیداتیو منجر به کاهش سنتز NO می گردد. ژن eNOS درسنتز NO نقش بسزائی ایفا می-کند. ازبین ژن های متعدد، ژن eNOS بعنوان یک کاندیدای مهم در بیماریهای عروق کرونری بطور وسیعی مطالعه گردیده است (۱۳). پلی مورفیسم های متعددی در ژن eNOS کشف شده است که با تولید NO در ارتباط است اما پلی مورفیسم T-786C از همه اینها مهمتر می باشد. پلی مورفیسم T-786C در ناحیه پروموتور ژن eNOS با mRNA eNOS کاهش یافته و با سطوح نیتریت/نیترات سرم در ارتباط است. اندازه گیری های ژن eNOS و فعالیت های باندینگ پروموتور اثرات پلی مورفیسم T-786C در روی فعالیت eNOS را تائید می کند (۱۳).

مطالعات محققین در مورد پلی مورفیسم T-786C و پلی مورفیسم های مهم دیگر می تواند بطور مناسبی در تغییر بیان ژن eNOS نقش داشته باشد. با بیان ناقص این ژن می توان انتظار بیماریهای عروقی شامل سکته قلبی، فشارخون، بیماری عروق کلیوی و بیماری عروق مغزی نخاعی را داشت (۷).

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعات دیگر در ژاپن نیز نشان می دهدکه واریانت T/C در ناحیه پروموتور می تواند با کاهش فعالیت پروموتور eNOS و در نتیجه بیماری عروقی ارتباط داشته باشد (۷). بر طبق Nakayama و همکاران، آلل C –۷۸۶ می تواند با کاهش معنی داری از فعالیت پروموتور ژن eNOS ارتباط داشته باشد. آنها یک موتاسیون T-786C در ناحیه۵'– Flanking ژن eNOS پیدا نمودند که با اسپاسم کرونری ارتباط دارد (۱۵و۱۴). وجود آلل C منجر به کاهش تولید NO شده و اسپاسم عروق کرونری را سبب می شود. اکثر محققین (۱۸–۱۶)، پیشنهاد می کنند که در هموزیگوت CC، اسپاسم کرونر ممکن است شدید باشد زیرا که وجود ژنوتیپ –۷۸۶ CC eNOS منجر به ایجاد یک CAD زود هنگام و سکته قلبی حاد با خطرات زیاد می شود(۱۶).

اخیرا" مطالعات متعدد نشان می دهد که موتاسیون های زیادی از ژن eNOS وجود دارد و این موتاسیون ها ممکن است یک ریسک فاکتوری برای CAD، MI و هیپرتانسیون باشد. آنها همچنین مشاهده نمودند که این پلی مورفیسم ها بطور زیادی در بین انواع نژادها با هم فرق دارد، این پلی مورفیسم ها شامل T-786C، Glu298Asp، a/4b۴ و G894T می باشد (۱۹).

در جمعیت ترکیه نیز ارتباط بین موتاسیون T-786C از ژن eNOS و CAD نیز بررسی شده است. براساس نتایج به وجود آمده بین الل C و CAD یک ارتباط معنی دار وجود دارد. در پلی مورفیسم T-786C، یک تیمیدین جایگزین شده توسط یک سیتوزین در نوکلئوتید –۷۸۶ (T-786C) نتیجه شده است، توسط مطالعات متعدد ارتباط پلی مورفیسم T-786C ژن eNOS با بیماری های دیگر از جمله MI، هیپرتانسیون و ایجاد و شدت CAD نیز بررسی شده است. Rossi و همکاران ارتباط معنی داری را بین موتاسیون T-786C و CAD پیدا نموده اند (۱۹).

طی تحقیقات دیگر پلی مورفیسم T-786C بعنوان ارتباط با اسپاسم کرونری در جمعیت ژاپن نیز گزارش گردیده است و این گزارشات یک ارتباط بین موتاسیون T-786C از ژن eNOS و حضور و شدت CAD را نشان می دهند (۲۰).

ارتباط بین پلی مورفیسم T-786C و خطرات CAD حتی بعد از متعادل کردن ریسک فاکتورهای قوی دیگر، نشان می دهد که این پلی مورفیسم می تواند بطور غیر وابسته ای در شروع اتیولوژی بیماری نقش داشته باشد (۲۳و۲۲و۲۱). همچنین در عربستان سعودی نیز فراوانی پلی مورفیسم T-786C ژن eNOS را در گروه سالم و CAD مقایسه کردند که نتیجه معنی دار بود. آنها نشان داده‌اند که در جمعیت سعودی پلی مورفیسم T-786C ژن eNOS بطور غیروابسته ای با CAD در ارتباط است و در حضور ریسک فاکتورهای قوی خطر پیشرفت CAD بیشتر می شود (۲۴)، بعلاوه فراوانی ژنوتیپ T-786C در بیماران CAD و جمعیت سالم در قسمت ترک (قفقازی) بیشتر بود. طبق نظر محققین این مطالعات محدود می باشند چون جمعیت کمی برای نمونه گیری انتخاب می شوند. با وجودی که پلی مورفیسم T-786C و بعضی پلی مورفیسم های دیگر در پیشرفت CAD دخیل هستند اما برای اطمینان بیشتر، نظر محققین این است که بهتر است از جمعیت زیادی نمونه گیری انجام گردد و آزمایشات دوباره تکرار گردند تا با دقت بیشتری نظر داده شود (۲۴).

در گزارشات دیگر در بیماران ترک (قفقازی)، پلی مورفیسم T-786C از ژن eNOS که در ناحیه پروموتور ژن پیدا شده است (صرف نظر از عوامل خطر دیگر) بطور معنی داری با شدت CAD ارتباط داشت (۲۵). ابتدا در بیماران وازواسپاسم کرونری، موتاسیون T-786C مشاهده شده در ناحیه پروموتور eNOS منجربه کاهش سرعت ترانس کریپشن گردیده و همچنین کاهش پروموتور ژن eNOS می شود (۱۷) که در نتیجه منجر به کاهش تولید NO در رگ های خونی گردیده و عملکرد غیرطبیعی اندوتلیال را به وجود می آورد (۲۶). Han و همکاران (۱۵) نشان دادند که پلی مورفیسم T-786C در ژن eNOS با یک افزایش خطر CAD در جمعیت چینی ارتباط دارد. در این افراد eNOS mRNA پایین و کاهش سطوح نیتریت/نیترات سرم مشاهده شده است (۱۷).

در مطالعه حاضر نیز کاهش معنی داری در NO سرم افراد بیمار و یک افزایش معنی دار در الل C افراد بیمار در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید، بدین صورت که فراوانی الل C در حالت کل در گروه بیمار بیشتر از گروه کنترل بود یعنی مجموع درصد (TC+CC) در افراد بیمار بیشتر از درصد TT بود. حالت CC هموزیگوت در پیشرفت آترواسکلروز خیلی مهمتر از حالات دیگر می باشد. علت کاهش NO در گروه بیمار ممکن است بعلت عملکرد غیر طبیعی اندوتلیال باشد که در CAD بعلت غیرطبیعی بودن عملکرد اندوتلیال NO به خوبی سنتز نمی شود.

پلی مورفیسم T-786C مهمترین پلی مورفیسم در ژن eNOS می باشد بنابراین منجر به کاهش آنزیم مربوط به سنتز NO شده و در نتیجه کاهش تولید NO می گردد. الل C وقتی به جای الل T می نشیند تغییر در پروموتور eNOS انجام می گیرد و در نتیجه سنتز به خوبی انجام نمی شود و در اکثر مطالعات در اثر غالب بودن الل C بر الل T، NO کاهش می یابد و چون NO مهمترین فاکتور اتساع دهنده عروق می باشد، همین امر ممکن است زمینه را برای افزایش فشار خون و بیماری آترواسکلروز فراهم می سازد.

نتیجه گیری

کثرت پلی مورفیسم T-786C ژن eNOS در گروه بیماران CAD ممکن است موجب کاهش تولید NO و افزایش فشار خون و بدین ترتیب پیشرفت آترواسکلروز در بیماران گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the NTERHEARTSTUDY). *Lancet* 2004; **364**: 937-952.
2. Fatini C, Sofi F, Sticchi E. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T-786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2004; **147**: 516-521.
3. R.Rosik E. Arginine fights coronary artery disease. *Life Enhancement* 2002; **3**: 1-7.
4. Kotur-stevuljevic J, Memon L. Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients. *Clinical Biochemistry* 2007; **40**: 181-187.
5. Cardiology, swiss cardiovascular centre, Bern, Switzerland. Coronary artery disease, nitric oxide and oxidative stress:the''yin-yang''effect achinese concept for a worldwide pandemic.*swiss Med wkly* 2006; **136**: 103-113.
6. Nasreen S, Nabika T, Shibata H, Moriyama H. T-786C polymorphism in endothelial NO synthase gene affects cerebral circulation in smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22**: 605-610.
7. Senthil D, Raveendran M, H.Shen Y. Genotype-Dependent Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOs) and Its Regulatory Proteins in Cultured Endothelial Cells. *DNA Cell Biol* 2005; **24**(4): 218-224.
8. Ciftci C, Melil S, Cebi Y, Ersoz M, Cagatay P. Association of endothelial nitric oxide synthase promoter region (T-786C) gene polymorphism with acute coronary syndrome and coronary heart disease. *Lipids in Health and Disease* 2008; **7**(5): 1-6.
9. Miranda K, Espey M, Wink D. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Biology and Chemistry* 2001; **5**(1): 62-71.
10. Soydinc S, Celik A, Demiryurek S, Davutoglu V, Tarakcioglu M, Aksoy M. The relationship between oxidative stress, nitric oxide, and coronary artery disease. *Eur J Gen Med* 2007; **4**(2): 62-66.
11. Kayyum-Shaikh A, Suryakar AN. Oxidative stress and antioxidant status before and after supplementation of A-Z anti-oxidant tablets in coronary artery disease. *Biom Res* 2009; **20**(2): 136-140.
12. Shaikh AK, N.Suryakar A. Oxidative stress, endothelial dysfunction and status of L- arginine and nitric oxide in coronary artery disease. *Biom Res* 2008; **19**(3): 211-214.
13. Cattaruzza M, Guzik TJ, Słodowski W. Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease. *Circ Res* 2004; **95**: 841–847.
14. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, et al. T 2786 3 C mutation in the 59-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 1999; **99**: 2864–2870.
15. Han Y, Xu W, Zhang W, Liu N, Ji Y. T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Pharmacology* 2010; **85**: 211-216.
16. Alvarez R, Gonzalez P, Batalla A, R.Reguero J, Iglesias- Cubero G, Hevia S, et al. Association between the NOS3 (-786 T/C) and the ACE (I/D) DNA Genotypes and Early Coronary Artery Disease. *Biology and Chemistry* 2001; **5**(4): 343-348.
17. Junyan L, Xinxing W, Xingwang L, Guoyin F, Lin H, Yongyong S. The endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary artery disease: a meta-analysis. *Cardiology* 2010; **116**: 271-278.
18. A.Kunnas T, Ilveskoski E, Niskakangas T, Laippala P. Association of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with risk of coronary artery disease and myocardial infarction in middle-aged men. *J Mol Med* 2002; **80**: 605–609.
19. Rossi GP, Cesari M, Zanchetta M, Colonna S. The T-786 C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study. *J Am Coll Cardiol* 2003; **41**(6): 930–937.
20. Tangurek B, Ozer N, Sayar N, Terzi S, Yilmaz H. The relationship between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (T-786 C) and coronary artery disease in the Turkish population. *Heart Vessels* 2006; **21**: 285-290.
21. Fatini C, Sofi F, Gensini F. Influence of eNOS gene polymorphisms on carotid atherosclerosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; **27**: 540–544.
22. Fatini C, Sofi F, Sticchi E. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T–786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2004; **147**: 516–521.

Archive of SID

www.SID.ir

23. Jaramillo PC, Lanas C, Lanas F. −786T>C polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene in Chilean subjects with coronary artery disease and controls. *Clin Chim Acta* 2008; **387**: 105–108.
24. Alkharfy K, Hussain T. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (894G›T and -786T›C) and risk of coronary artery disease in a Saudi population. *Archives of Medical Research* 2010; **41**: 134-141.
25. Rossi G, Cesari M, Zanchetta M, Colonna S, Maiolino G. The T-786C Endothelial Nitric Oxide Synthase Genotype Is a Novel Risk Factor for Coronary Artery Disease in Caucasian Patients of the GENICA Study. *J Amer Coll Cardio* 2003; **41**(6): 930-937.
26. Kim IJ, Bae J, Lim SW, Cha DH, Cho HJ. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T›C, 4a4b, 894G›T) in Korean patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 2007; **119**: 579-585.

Archive of SID

www.SID.ir